

Evaluación de un nuevo ensayo de ELISA (Bartels) para la detección de antígeno de *Legionella pneumophila* en orina

Fernando de Ory

Servicio de Microbiología Diagnóstica. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

FUNDAMENTO. La detección de antígenos solubles de *Legionella pneumophila* es un método que permite el diagnóstico rápido de la neumonía producida por la bacteria. Recientemente se ha comercializado un nuevo ensayo de ELISA (*Legionella* Urinary Antigen, Intracel, Issaquah, Washington, EE.UU.), para la detección de antigenuria, que se ha comparado con un método bien establecido de ELISA (Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay kit, Binax, Portland, Maine, EE.UU.).

MÉTODO. Se ha evaluado el método ELISA-Bartels, para lo que se han ensayado muestras de orina previamente caracterizadas por ELISA-Binax. Las muestras procedían de brotes de *Legionella* (n = 48), de casos esporádicos de legionelosis (n = 38) y de niños con neumonía producida por virus (n = 21). Se han empleado, además, muestras procedentes del Control de Calidad Externo de *Legionella* del Grupo Europeo de Trabajo sobre Infecciones por *Legionella* (n = 102). De todas las muestras analizadas, 109 eran positivas en ELISA-Binax, dos eran equívocas y 98 negativas. Las muestras con resultado equívoco han sido excluidas del análisis.

RESULTADOS. La sensibilidad del ELISA-Bartels en relación con ELISA-Binax ha sido del 98,2% (107/109) y la especificidad del 82,7% (81/98). De las 17 muestras que presentaron resultado positivo en el ensayo evaluado y que fueron negativas en el de referencia, 10 fueron positivas en éste después de concentrar por ultrafiltración selectiva, y seis más revelaban una serología indicativa o compatible de infección por *Legionella*, por lo que fueron clasificadas como verdaderas positivas.

CONCLUSIONES. El método evaluado pone de manifiesto unas buenas características de sensibilidad, mejorando incluso la del ELISA-Binax, y de especificidad, por lo que lo consideramos adecuado para el diagnóstico de la neumonía por *Legionella*.

Palabras clave: *Legionella pneumophila*. Antigenuria. ELISA.

Evaluation of a new ELISA (Bartels) for detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine

BACKGROUND. Detection of *Legionella pneumophila* soluble antigens allows rapid diagnosis of pneumonia caused by these bacteria. A new ELISA (Bartels) for antigenuria detection has recently been commercialized. We compared the new ELISA with another well-established ELISA (Binax).

METHODS. To evaluate ELISA-Bartels (*Legionella* Urinary Antigen, Intracel, Issaquah, Washington, United States), urine samples previously characterized by ELISA Binax (*Legionella* Urinary Antigen Enzyme Immunoassay Kit, Binax, Portland, Maine, United States) were used. Samples came from *Legionella* outbreaks (n = 48), from sporadic legionellosis (n = 38), and from children with viral pneumonia (n = 21). Samples from the External Quality Control of *Legionella* of the European Working Group on *Legionella* Infections (n = 102) were also tested. Of the samples analyzed, 109 were positive in ELISA-Binax, 2 were equivocal and 98 were negative. Samples showing equivocal results were excluded from the analysis.

RESULTS. The sensitivity of ELISA-Bartels in comparison with that of ELISA-Binax was 98.2% (107/109) and specificity was 82.7% (81/98). In the 17 samples that were positive in ELISA-Bartels and negative in ELISA-Binax, 10 were positive in ELISA-Binax after concentration by selective ultrafiltration and 6 further cases showed serology indicating or compatible with recent *Legionella* infection and were thus classified as true positives.

CONCLUSIONS. ELISA-Bartels showed good sensitivity and specificity. Sensitivity was even higher than that of ELISA-Binax. Thus, we consider it to be an appropriate method for diagnosis of *Legionella* pneumonia.

Key words: *Legionella pneumophila*. Antigenuria. ELISA.

Introducción

En los últimos años se han aplicado al diagnóstico de la neumonía por *Legionella pneumophila* diversos ensayos para la detección de antígenos solubles de la bacteria, que incluyen aglutinación de látex (AL), radioinmunoanálisis (RIA), enzimoimmunoanálisis (EIA) e inmunocromatografía (IC). En tanto que el ensayo de AL

Correspondencia: Dr. F. de Ory.
Servicio de Microbiología Diagnóstica. Instituto de Salud Carlos III.
28200 Majadahonda (Madrid).
Correo electrónico: fory@isciii.es

Manuscrito recibido el 12-06-2001; aceptado el 5-09-2001.

TABLA 1. Resultados obtenidos en los métodos comparados

	Resultado obtenido en Elisa-Binax/ELISA-Bartels				
	Positivo/Positivo	Positivo/Negativo	Equívoco/Positivo	Negativo/Positivo	Negativo/Negativo
Panel 1 (48)	18			12	18
Panel 2 (38)	32	2		3	1
Panel 3 (21)					21
Panel 4 (102)	57		2	2	41
Total	107	2	2	17	81

demostró ser poco sensible y específico¹, los métodos de RIA, EIA e IC han revelado tener buenas características de sensibilidad y especificidad²⁻⁴, hasta el punto de que hoy día se acepta la detección de antígenos en la orina como prueba confirmatoria de la infección por *L. pneumophila*. Se dispone de diversos métodos de origen comercial para la detección de antigenuria que han demostrado ser aplicables al diagnóstico. Por una parte, Binax (Portland, Maine, EE.UU.) produce reactivos tanto de RIA como de EIA y de IC, todos ellos métodos diseñados para detectar antígenos de *L. pneumophila* SG1. Por otra parte, Biotest (Dreieich, Alemania) produce reactivos de ELISA con un diseño que, en teoría, permite el reconocimiento adicional de otras especies y serogrupos⁵. Sin embargo, la realidad es que tanto los ensayos de ELISA-Binax como ELISA-Biotest reconocen prácticamente las mismas especies y serogrupos; el ensayo de Biotest reconoce mejor sólo *L. pneumophila* SG6⁶.

En el último año se ha comercializado un nuevo ensayo de ELISA (ELISA-Bartels, *Legionella* Urinary Antigen, Intracel, Issaquah, Washington, EE.UU.) con un diseño que permite, al igual que sucede con los métodos de Binax, la detección de antígenos de *L. pneumophila* SG1. Para evaluar este reactivo se han empleado muestras de orina previamente caracterizadas por el ensayo de ELISA-Binax y que han sido coleccionadas durante un período de 5 años en el Centro Nacional de Microbiología.

Material y método

Se ha procesado un total de 209 muestras de orina, agrupadas en 4 paneles:

1. Un total de 48 muestras de dos brotes que ocurrieron en Alcalá de Henares en 1996, y en Vigo, en 2000, de las que 18 eran positivas sin concentración previa, y nueve más lo fueron sólo después de concentrar 25 veces por ultrafiltración selectiva.

2. Un total de 38 muestras de casos esporádicos, de las que 34 eran positivas sin concentración, y las cuatro restantes lo fueron después de concentración.

3. Un total de 21 muestras de niños con neumonía por gripe A (un caso) o por virus respiratorio sincitial (20 casos), todas negativas en ELISA-Binax.

4. Un total de 102 muestras procedentes de material sobrante del Control de Calidad Externo de *Legionella* (External Quality Control on *Legionella*, EQCL) del European Working Group on *Legionella* Infections, de las que 57 eran positivas, dos equívocas y 43 negativas en ELISA-Binax.

Todas las muestras se conservaron a -20 °C desde el momento de su caracterización original hasta su uso para la evaluación.

Ambos ensayos se procesaron siguiendo rigurosamente las instrucciones del fabricante.

Los resultados obtenidos con el método ELISA-Bartels se compararon con los obtenidos por el ensayo de ELISA-Binax (*Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay kit, Binax). La concentración de las muestras, cuando se requirió, se realizó por ultrafiltración selectiva, empleando el kit Minicon B15 (Amicon Millipore, EE.UU.)⁷, de forma que se obtenía la muestra concentrada 25 veces. Las determinaciones de anticuerpos totales frente a *L. pneumophila* se llevaron a cabo por inmunofluorescencia indirecta, empleando un método estándar⁸.

Resultados

Los resultados obtenidos en cada grupo de muestras se presentan en la tabla 1.

Se ha obtenido resultado positivo en el método evaluado en 30 muestras del panel 1, incluyendo todas las muestras positivas en ELISA-Binax, seis muestras que fueron positivas sólo después de concentrar y seis que fueron negativas incluso después de concentrar. En el panel 2 fueron positivas 35 muestras, incluyendo tres que fueron positivas en ELISA-Binax después de concentrar. Todas las muestras del panel 3 resultaron negativas. Por último, en el panel 4 resultaron positivas todas las muestras que eran positivas en ELISA-Binax, así como dos equívocas y dos negativas.

La comparación de los resultados del ensayo en evaluación con respecto al de ELISA-Binax, al analizar muestras sin concentrar, se presentan en la tabla 2. La sensibilidad del ensayo ha sido del 98,2% (107/109), y la especificidad del 82,7% (81/98).

En la tabla 3 se relacionan las muestras con resultado discrepante entre ELISA-Binax y el método en evaluación, así como su clasificación final en relación con la infección por *Legionella*. Todas las muestras discrepantes del panel 1 se consideran casos de *Legionella*, dado que todas proceden de brotes bien documentados y tienen resultado positivo de antígeno en orina por ELISA-Binax después de concentrar por ultrafiltración selectiva (6 casos) o tienen serología indicativa (seroconversión) o compatible (título alto) (6 casos). Dos muestras (una del panel 2 y otra del panel 4) se han considerado no valorables, dado que se ha obtenido resultado positivo en un solo ensayo, y no había

TABLA 2. Comparación de resultados obtenidos en los métodos ELISA-Bartels y ELISA-Binax

	ELISA-Binax		
	Positivo (109)	Equívoco (2)	Negativo (98)
ELISA-Bartels Positivo (126)	107	2	17
Negativo (83)	2		81

TABLA 3. Muestras discrepantes

	ELISA-Binax	ELISA-Bartels	Otros datos	Clasificación final
Panel 1. Muestras de brotes de neumonía por <i>Legionella</i>				
1.817/6	Negativo	Positivo	Sc, Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.815/6	Negativo	Positivo	Sc, Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.737/6	Negativo	Positivo	Sc, Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.977/6	Negativo	Positivo	Ta, Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.727/6	Negativo	Positivo	Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.849/0	Negativo	Positivo	Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.761/6	Negativo	Positivo	Sc, Negativo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.966/6	Negativo	Positivo	Sc, Negativo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.983/6	Negativo	Positivo	Ta, Negativo en ELISA-Binax 25x	Positivo
2.006/6	Negativo	Positivo	Ta, Negativo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.996/6	Negativo	Positivo	Sc, Negativo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.975/6	Negativo	Positivo	Ta, Negativo en ELISA-Binax 25x	Positivo
Panel 2. Casos esporádicos de neumonía por <i>Legionella</i>				
1.186/0	Positivo	Negativo	Neumonía	No valorable
43/1	Positivo	Negativo	Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.430/9	Negativo	Positivo	Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.293/0	Negativo	Positivo	Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
1.659/0	Negativo	Positivo	Positivo en ELISA-Binax 25x	Positivo
Panel 4. Muestras EQCL				
3	Equívoco	Positivo	Neumonía	Positivo
23	Negativo	Positivo	PCR en orina, FD	Positivo
52	Negativo	Positivo	Sin más datos	No valorable
58	Equívoco	Positivo	Neumonía en viajero	Positivo

Sc: seroconversión; Ta: título alto; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; FD: fluorescencia directa.

ningún otro resultado positivo (tabla 3). El resto de las muestras de estos paneles se han clasificado como positivas.

Discusión

La mejor aproximación para el diagnóstico de la infección por *Legionella* es el aislamiento de la bacteria que, además, permite la realización de estudios epidemiológicos y su caracterización molecular. Sin embargo, el aislamiento de *Legionella* puede resultar complicado para muchos laboratorios clínicos a causa de las características de crecimiento de la bacteria, que sólo crece en medios específicos. Además, es difícil obtener una muestra adecuada, dado que en la neumonía por *Legionella* la tos es poco productiva y no se pueden obtener esputos de calidad, así como por la dificultad de obtener muestras profundas. Por otra parte, los estudios serológicos permiten la caracterización retrospectiva de gran número de casos mediante la detección de seroconversión o de IgM, como sucedió en un brote ocurrido en la Comunidad de Madrid^{9,10}, lo que resulta de gran interés epidemiológico, aunque son de escasa utilidad clínica, ya que no proporcionan un diagnóstico rápido.

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos para la detección de antígenos solubles de *Legionella* en orina, que suponen ciertas ventajas sobre las otras aproximaciones diagnósticas: permiten un diagnóstico rápido, la muestra a analizar es fácilmente disponible y muestra valores de sensibilidad próximos al 60%, con una especificidad absoluta²⁻⁵. La concentración de la muestra por ultrafiltración selectiva, si bien puede alargar el proceso, permite mejorar la sensibilidad de la detección de antigenuria desde el 60 hasta el 80%⁷.

El método ELISA-Bartels se ha aplicado sobre muestras de orina procedentes de diferentes situaciones.

Cuando se analizan muestras de casos de infección respiratoria en niños pequeños producida por virus se obtiene una concordancia absoluta, lo que sugiere una especificidad equivalente de ambos ensayos, y muy alta, y que ya ha sido documentada para los ensayos disponibles en el mercado²⁻⁵. Cuando se analizan casos de neumonía por *Legionella* se observan situaciones diferentes. Al ensayar muestras de casos esporádicos, la concordancia entre ambos ensayos es muy alta, ya que se obtiene el mismo resultado en 33/38 muestras (86,8%). Igual sucede cuando se analizan muestras procedentes del EQCL, en el que presentan concordancia 98/102 muestras (96,1%). No sucede lo mismo, sin embargo, en muestras procedentes de brotes de neumonía por *Legionella*, en las que se observa una marcada mayor capacidad de detectar resultados positivos del ELISA-Bartels en relación con el ensayo de referencia, ya que se identifican como positivas 12 muestras que eran negativas en el ensayo ELISA-Binax. Aparte de que estos casos procedían de brotes bien caracterizados de *Legionella*, estas muestras eran positivas en el ensayo ELISA-Binax después de concentrar 25 veces (6 muestras) y/o mostraban seroconversión (6 muestras) o título alto (5 muestras), lo que confirma que eran casos de *Legionella* auténticamente positivos. Por tanto, parece que el ensayo evaluado tiene mayor sensibilidad que el ELISA-Binax.

Una posible explicación al hecho de que el ensayo ELISA-Bartels sea más efectivo, sobre todo en muestras de brotes, algunas de las cuales son negativas en ELISA-Binax y positivas sólo después de concentrar, es que en los brotes, como consecuencia de la intensa investigación epidemiológica, se estudian también casos de gravedad menor, en tanto que los casos esporádicos que llegan al laboratorio suelen ser casos muy graves. Recientemente se ha documentado que la sensibilidad de la detección de antigenuria está en relación directa con la

gravidad de los casos, de forma que todos los casos de un brote que requirieron respiración asistida fueron positivos, en tanto que en situaciones de menor gravedad la sensibilidad disminuyó¹¹.

Un posible inconveniente derivado de la mayor sensibilidad del ELISA-Bartels es el tiempo que dura la excreción de antígenos después de la neumonía. Sopena et al¹² estudiaron a 42 pacientes con antigenuria positiva por ELISA, mensualmente durante los 4 primeros meses y cada 3 meses hasta la negativización, y observaron que el 66,7% excretaba antígeno durante los primeros 2 meses, el 26,2% entre 2-6 meses, el 4,2% más de 6 meses y el 2,1% excretaba durante más de un año. Por otra parte, la persistencia de la excreción parece ser mayor en los pacientes con tratamiento con corticoides¹³. Es de esperar que si se emplea un análisis más sensible pueda detectarse la excreción de antígenos durante más tiempo, lo cual comprometería la especificidad del ensayo.

Un aspecto de gran interés en la utilidad práctica de los ensayos de detección de antigenuria es el tiempo necesario para realizar el análisis. En el caso del ELISA-Bartels, el tiempo necesario es de 1 hora y 5 min, en contraste con las 2 h y 15 min que necesita el ELISA-Binax, siempre sin considerar el tiempo que se precisa para la concentración de la muestra por ultrafiltración selectiva. Sin embargo, el ensayo que, en este sentido, demuestra ser el más útil de todos los que en la actualidad hay en el mercado sigue siendo el ensayo de IC (Binax Now), que sólo precisa 15 min.

Como conclusión, el ensayo ELISA-Bartels presenta unas buenas características de sensibilidad, mejorando incluso la del ELISA-Binax, y de especificidad, que lo hacen adecuado al diagnóstico de la neumonía por *Legionella*.

Agradecimiento

A Tim Harrison, del Respiratory and Systemic Infection Laboratory, Public Health Laboratory Service, Central Public Health Laboratory, Colindale, Reino Unido, como responsable del Control de Calidad Externo de *Legionella* (EQCL, External Quality Control on *Legionella*) del European Working Group on *Legionella Infections*.

Bibliografía

1. Leland DS, Kohler RB. Evaluation of the CLONE *Legionella pneumophila* Serogroup 1 urine antigen latex test. *J Clin Microbiol* 1991;29:2220-3.
2. Plouffe JF, File TM, Breiman RF, Hackman BA, Salstrom SJ, Marston BJ, et al. Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary test antigen assay. *Clin Infect Dis* 1995;20:1286-91.
3. Domínguez JA, Matas L, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, et al. Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in both concentrated and non concentrated urine samples. *J Clin Microbiol* 1997;35:1627-9.
4. de Ory F. Evaluación del Binax Now *Legionella* Urinary Antigen Test para la detección de antígeno en orina. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999;17:314-5.
5. Harrison T, Uldum S, Alexiou Daniel S, Bangsberg J, Bernander S, Drasar V, et al. A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Clin Microbiol Infecc* 1998;4:359-65.
6. Benson RF, Tang PW, Fields BS. Evaluation of the Binax and Biotest Urinary antigen kits for detection of Legionnaires' diseases due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2763-5.
7. Domínguez JA, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, Padilla E, et al. Detection of *Legionella pneumophila* SG1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *J Clin Microbiol* 1996;34:2334-6.
8. Wilkinson HW, Cruce DD, Broome CV. Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. *J Clin Microbiol* 1981;13:139-46.
9. Comunidad de Madrid. Informe: brote de neumonía por *Legionella* en Alcalá de Henares. *Bol Epidemiol Com Madrid* 1997;4:1-26.
10. de Ory F, Echevarría JM, Pelaz C, Téllez A, Mateo MA, López J. Detection of specific IgM antibody in the investigation of an outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Clin Microbiol Infecc* 2000;6:64-8.
11. Wever PC, Yzerman EPF, Kuijper EJ, Speelman P, Dankert J. Rapid diagnosis of legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2000;38:2738-9.
12. Sopena N, Pedro-Botet ML, Matas L, Domínguez J, Sabria M. Duration of urinary antigen excretion in legionnaire's disease. Preliminary results. Libro de resúmenes, ICAAC San Francisco, 1999.
13. Sopena N, Pedro-Botet ML, Reynaga E, García M, Domínguez J, Matas L, et al. Role of corticotherapy in the persistence of urinary antigen of *Legionella pneumophila* and in the evolution of *Legionella* pneumonia. Libro de resúmenes. 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Estambul, 2001.